

## POTENCIÁL MODIFIKOVANÝCH NANOČÁSTIC V ANALYTICKÉ CHEMII

PAVEL ŘEZANKA, KAMIL ZÁRUBA  
a VLADIMÍR KRÁL

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
vladimir.kral@vscht.cz*

Došlo 15.1.07, přepracováno 24.4.07, přijato 21.6.07.

Klíčová slova: analytické aplikace, modifikované nanočástice, nanosenzory, nanoseparace, plasmonová rezonance

### Obsah

1. Úvod
  - 1.1. Historie
  - 1.2. Příprava nanočástic
2. Aplikace nanočástic
  - 2.1. Elektrochemické metody
  - 2.2. Spektrometrické metody
  - 2.3. Separační metody
  - 2.4. Ostatní metody
3. Závěr

### 1. Úvod

Metody přípravy a chemické modifikace nanočástic (objektů o rozměrech 1–200 nm), jsou v současnosti intenzivně rozvíjeny a využívány. Těmito postupy, které kombinují poznatky z chemie, fyziky nebo biologie, lze řídit tvar a velikost připravovaných nanočástic a dosahovat tak ojedinělých optických, elektronických a katalytických vlastností připravených materiálů<sup>1–5</sup>.

Protože v současné době byla již publikována řada prací využívajících systémů s nanočásticemi i v analytické chemii, je cílem tohoto článku upozornit na současný stav v této expandující oblasti elektroanalytických, spektroskopických i separačních metod.

#### 1.1. Historie

První zmínky o nanočásticích pocházejí z pátého nebo čtvrtého století př. n. l. z Egypta a Číny. Tehdy bylo objeveno „rozpuštěné zlato“, které bylo používáno jak pro estetické (výroba rubínového skla, barvení keramiky), tak pro léčivé účely (srdeční a sexuální problémy, úplavice, epilepsie a nádory a pro diagnózu syfilis).

V roce 1857 Faraday oznámil získání koloidního zlata redukcí vodného roztoku tetrachlorozlatitanu. Termín koloid (z francouzského *colle*) byl vytvořen Grahamem v roce 1861. V tomto období byly také připraveny další koloidní kovy.

Na rozkvět si ale tato oblast nanotechnologie, která je pokračováním koloidní chemie, musela počkat ještě jedno století. Z té doby pochází výrok laureáta Nobelovy ceny Richarda Feynmana „There is plenty of room at the bottom“, kterým navrhl směr pro rychle se rozvíjející vědeckou oblast nanotechnologie. Koncem 20. století už uměli vědci manipulovat s atomy, molekulami a klastry na površích. Miniaturizace struktur konvenční a elektronovou litografií dosahuje teoretického limitu kolem 50 nm. Pro další miniaturizaci musely být vyvinuty alternativní metody. A tak vědci následující Feynmanovu vizi použili atomy a molekuly jako stavební jednotky pro kompletaci struktur v řádech nanometrů „zdola nahoru“. Unikátní elektrické vlastnosti těchto nanočástic<sup>6,7</sup>, stejně jako jejich optické a fotofyzikální vlastnosti, jako je velikostí kontrolovaná plasmonová absorpce, elektronová generace páru elektron-díra a fluorescence, umožňují částicím předávat elektronické a fotonové signály.

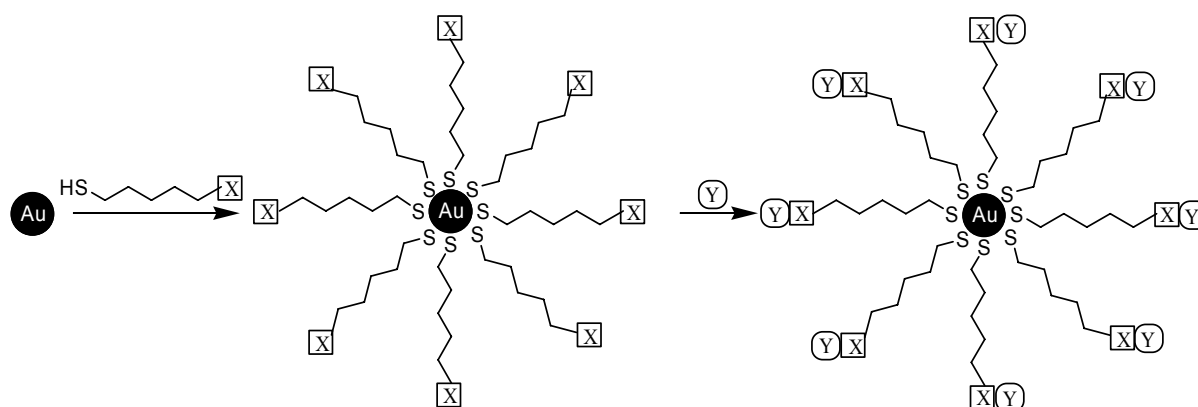
#### 1.2. Příprava nanočástic

Již při přípravě vlastních nanočástic je třeba uvážit jejich další aplikaci. Nanočástice mohou být připraveny různými metodami a lze tak dosáhnout požadovaných velikostí a tvarů a tím i požadovaných chemických a fyzikálních vlastností. Mezi nejrozšířenější typy patří nanočástice kovů (např. zlata, stříbra), nanočástice oxidů (křemičitého, titaničitého), sulfidů (kadmenného), selenidů (kadmenného) a polymerní nanočástice (kopolymery, dendrimery).

Chemická metoda přípravy nanočástic kovů je založena na nukleaci a růstu tuhé fáze. Tento proces je nejčastěji vyvolán chemickou redukcí solí kovů. Ke kontrole růstu nanočástic a k jejich ochraně před agregací je používáno velké množství stabilizátorů, např. donorové ligandy (např. thioly) nebo polymery. První reprodukovatelný standardní návod pro přípravu koloidů kovů publikoval Turkevitch<sup>8</sup>, který také navrhl mechanismus pro tvorbu nanočástic založený na nukleaci, růstu a agregaci a je stále platný.

Redukce solí přechodných kovů v roztoku je nejvíce rozšířená metoda pro přípravu koloidních suspenzí kovů a je velmi jednoduše proveditelná. Umožňuje, aby byly v gramových množstvích připraveny koloidní nanočástice požadované velikosti s malou odchylkou. Za tímto účelem je používán široký rozsah redukčních činidel, např. hydridy ( $\text{NaBH}_4$ ) a soli (citrát sodný)<sup>9</sup>.

Kromě přípravy nanočástic kovů lze získat i nanočástice jejich oxidů, sulfidů a selenidů, jejichž využití ale není



Obr. 1. Schéma modifikace povrchu nanočástice; X – funkční skupina, Y – látka mající funkční skupinu interagující s X

tak široké, jako v případě samotných kovů. Syntéza je většinou prováděna ve vodných roztocích, ve kterých se jako redukční činidlo používá hydrazin nebo hydroxylamin<sup>2</sup>.

Polymerní nanočástice se většinou získávají řízenou polymerací ve vodě působením peroxidu vodíku, tepla nebo ultrazvuku<sup>10</sup>. Lze tak např. připravit kopolymery alginát sodný-chitosan a anthracen-polyakrylamid<sup>10</sup>.

Jak bylo uvedeno dříve, velikost částic a jejich distribuce zásadně ovlivňuje vlastnosti daných nanočástic. K metodám umožňujícím přístup k těmto informacím patří především metody elektronové mikroskopie<sup>11</sup> a metody studia povrchů – skenovací elektronová mikroskopie (SEM), mikroskopie atomárních sil (AFM), rentgenová fluorescenční spektroskopie (XFS), popř. spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS). Vedle těchto poměrně sofistikovaných metod lze v řadě případů získat dostačující informaci i např. metodou absorpční spektrometrie (UV-VIS spektrometrie) nebo elektrochemickými metodami.

Vzniklé nanočástice lze pro analytické účely použít přímo (nanočástice polymerů), ale většinou se provádí modifikace jejich povrchu (nanočástice kovů). Například u nanočástic zlata, které jsou velmi často používané, se modifikace provádí navázáním thiolem modifikovaných molekul, což vede k tvorbě kovalentních vazeb těchto molekul na nanočástice (obr. 1).

## 2. Použití nanočástic

Vedle základních prací demonstrujících všeobecné použití nanočástic, již existuje řada prací využívající nanočástice pro analytické účely. Analytické systémy s nanočásticemi totiž dosahují často lepších vlastností než systémy původní, ať už se jedná o možnost detekce nových analytů, snížení meze detekce a nebo zlepšení účinnosti separace.

### 2.1. Elektrochemické metody

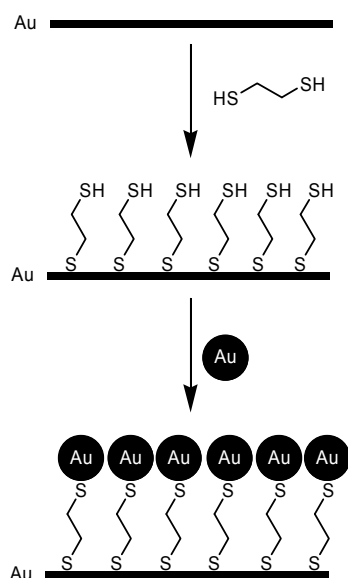
Mezi elektrochemické metody využívající modifikace povrchu elektrod nanočásticemi patří velmi často voltametrické metody. Používají se klasické elektrody, ale i mikroelektrody<sup>12</sup>. Nanočástice byly ale také využity v potenciometrii např. pro přípravu iontově selektivní elektrody<sup>13</sup>, senzorického pole<sup>12</sup> a elektronického jazyku<sup>14</sup>. Imobilizace na povrchu elektrod se provádí buď fyzikální adsorpcí a nebo pomocí chemického navázání, kdy modifikované nanočástice reagují s povrchem elektrody, na jejímž povrchu je navázána vhodná látka. Obzvláště vhodné pro chemickou modifikaci jsou zlaté elektrody, na jejichž povrch se naváže dithiol přes jednu z SH skupin a na druhé SH skupiny se naváží nanočástice<sup>15</sup> (obr. 2).

Jako příklad aplikace elektrod modifikovaných nanočásticemi, které umožnily snížit mez detekce o několik řádů, lze uvést stanovení  $\text{As}^{3+}$  diferenční anodickou rozpuštěcí voltametrií, pomocí níž bylo dosaženo detekčního limitu 0,09 ppb. Modifikace elektrody nanočásticemi zlata, na jejichž povrchu byl navázán poly(L-laktid), byla provedena cyklickou voltametrií. Získaná elektroda byla velice selektivní, takže vykazovala správnou odezvu i za přítomnosti dalších iontů o řádově vyšších koncentracích<sup>16</sup>.

Dalšími analyty detegovanými ve vodách byly např. dusičnany<sup>17</sup>, měďnaté ionty, pesticidy a herbicidy<sup>18</sup>. Elektroda citlivá na  $\text{As}^{3+}$  byla využita pro stanovení sulfidů v kyselých deštích<sup>19</sup>.

Pro stanovení těkavých organických látek bylo použito senzorové pole složené z pěti platinových elektrod modifikovaných různými nanočásticemi. Pro vyhodnocení byly použity neuronové sítě<sup>12</sup>.

Další použití našly elektrody modifikované nanočásticemi ve farmacii, kde slouží ke stanovení léčiv<sup>13</sup>, a v lékařství pro analýzy biologických vzorků<sup>20</sup>. Stanovovány byly např. hemoglobin, cytochrom c, glukosa a peroxid vodíku. Použité elektrody byly většinou biosenzory, v menší míře byly použity i chemické rozpoznávací systé-



Obr. 2. Schéma imobilizace nanočástic zlata na povrch modifikované zlaté elektrody

my. Za zmínku stojí i možnost detekce sekvencí DNA<sup>21</sup>, při které se využívají nanočástice s imobilizovaným oligonukleotidem. Výhodou je nízká mez detekce, takže odpadá nutnost použít PCR.

## 2.2.2. Spektrometrické metody

Jak bylo zmíněno v úvodu, spektrometrické metody patří mezi hlavní metody studia vlastností modifikovaných nanočástic, a proto i analytická stanovení těmito metodami patří mezi nejčtenější. Vlastnosti nanočástic, jako jsou jejich průměr, tvar, koncentrace a možnost interagovat s malými molekulami a biomolekulami, mají velký vliv na jejich optické vlastnosti.

Z pohledu přiměřené náročnosti přístrojového vybavení jsou využívány vedle již zmíněných metod absorpční spektrometrie (UV/VIS a IR) a spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS), také metody založené na rozptylu světla (rezonančním, dynamickém) a luminiscenční metody. Volba metody závisí především na vlastnostech použitých nanočástic. Typický experiment je založen na tvorbě směsi analytu (vzorku) a koloidu vytvořeného předem nebo *in situ*.

### Absorpční spektrometrie

Schopnost kolektivních oscilací valenčních elektronů jednotlivých nanočástic určitých kovů vede k možnosti sledování tzv. plasmonové rezonance, jejímž důsledkem je intenzivní absorpční pás ve viditelné oblasti spektra<sup>22</sup>.

Toho bylo využito např. pro stanovení lithných iontů ve vodném prostředí. Chemická modifikace zlatých nanočástic thiolovým derivátem molekuly komplexující selektivně lithium umožnila použití tohoto systému ve vodném

prostředí, ve kterém samotný selektor není rozpustný<sup>23</sup>. Změny absorpčního spektra ve viditelné oblasti umožnily stanovit koncentrace lithných iontů v přítomnosti Na<sup>+</sup> a K<sup>+</sup>. Selektor na bázi cyklických etherů umožňuje stanovení ostatních alkalických iontů (sodných a draselných)<sup>24</sup>.

Sledováním změn plasmonového absorpčního pásu nanočástic při biomolekulárních interakcích bylo v mnoha případech dosaženo velmi nízkých detekčních limitů ( $10^{-9}$  mol l<sup>-1</sup>). Na nanočástice zlata byly navázány peptidy, enzymy nebo léčiva<sup>25,26</sup>, popř. byly nanočásticemi značeny viry<sup>25</sup>.

Závislost vlnové délky plasmonové absorpce na velikosti nanočástic a jejich agregátů byla využita v jednoduché metodě detegující olovnaté ionty, které svou přítomností rozrušují daný nanočásticový systém a mění tím jeho barvu, resp. absorpční spektrum<sup>27</sup>. Na stejném principu je založena i detekce adenosinu<sup>28</sup>.

Kovové nanočástice lze modifikovat i jinak než kovalentní vazbou. Příkladem může být nanočásticový systém reagující na glukosu, který byl připraven oxidací aminofenylboronového derivátu polyvinylalkoholu v přítomnosti zlatité soli<sup>29</sup>.

### Rozptylové techniky

Mezi nejčastější analytické metody využívající tohoto jevu patří povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS) a rezonanční rozptyl laserového záření (RLS). Zatímco SERS vychází z posunu vlnových délek rozptýleného záření (Ramanův jev), který je mnohonásobně zesílený plasmonovou rezonancí, při rezonančním rozptylu světla k posunu vlnových délek nedochází, nicméně plasmonová rezonance funguje i zde (chová se jako chromofor) a opět zesiluje intenzitu rozptýleného záření<sup>30</sup>.

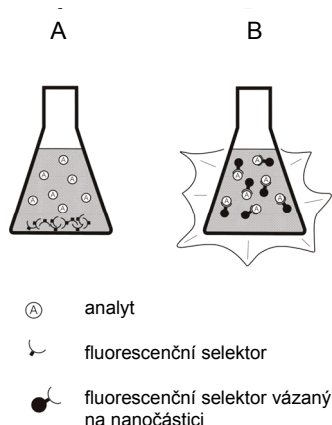
Tento princip umožnil např. identifikaci barviv odebráním nepatrného vzorku malby z malířského plátna<sup>31</sup> nebo vypracování několika technik detekce biomarkerů určitých druhů rakoviny<sup>20</sup> a potenciálních léčiv<sup>32</sup>.

### Luminiscenční techniky

Rada vhodně modifikovaných kovových nanočástic vykazuje po interakci s různými látkami výrazný nárůst intenzity fluorescence, zatímco emise fluorescence samotných nanočástic je obvykle velmi slabá. Vypracováno bylo několik systémů využívajících komplexů lanthanoidů s různými ligandy a využity k detekci např. nukleových kyselin<sup>33</sup> a chinolonů<sup>30,33</sup> (obr. 3).

Nanobiosenzor na detekci určitých sekvencí DNA byl připraven také modifikací nanočástic zlata oligonukleotidovým „roznávacím“ řetězcem zakončeným fluoroforem, který byl rovněž vázán na povrch nanočástice. V přítomnosti cílové sekvence DNA došlo v důsledku tvorby dvoušroubovice k uvolnění fluoroforu z povrchu nanočástice a k nárůstu fluorescence<sup>34</sup>.

Mírně odlišným případem jsou nanokrystaly CdS nebo CdSe, které patří mezi tzv. kvantové tečky. Jedná se o nanostruktury o velikosti 2–10 nm s unikátními vlastnostmi ve smyslu kontroly jejich fyzikálních vlastností<sup>35</sup> (např. „laditelnost“ optických vlastností).



Obr. 3. Použití ve vodě nerozpustné fluorescenční značky pro stanovení analytu ve vodném prostředí; (A) použití fluorescenční značky bez imobilizace na nanočástice, (B) po imobilizaci na nanočástice

V současnosti kvantové tečky, které jsou rozpustné ve vodném prostředí a vykazují stabilní fotoluminiscenci, tvoří celou skupinu fluorescenčních značek pro mnoho biologických a bioanalytických aplikací.

Nanokrystaly (kvantové tečky) CdSe modifikované 11-merkaptoundekanovou kyselinou vykazují nárůst fluorescence v přítomnosti lysozymu, proteinu, který bývá označován jako vlastní antibiotikum lidského těla<sup>36</sup>. Modifikací těchto nanokrystalů cysteinem bylo dosaženo biokompatibility, rozpustnosti ve vodě a možnosti stanovit rtuťnaté ionty díky interakci s  $\text{NH}_2$  skupinou obsaženou v modifikovaných nanočásticích<sup>37</sup>.

Jinou zajímavou skupinou jsou také polymerní nanočástice vykazující fluorescenci. Obvykle jsou tvořeny polymerizací vinylového nebo akrylového monomeru s navázaným fluoroforem (naftalen, anthracen, apod.). Sledování zhášení fluorescence určitými těžkými kovy bylo využito v řadě prací popisujících stanovení dvojmocné rtuti nebo šestimocného chromu<sup>10</sup>.

### 2.3. Separační metody

Požadavek rychlé a účinné analýzy chemických a biochemických vzorků vytváří stálý tlak na vývoj separačních metod, který se projevuje především miniaturizací jednotlivých klíčových prvků nebo celého separačního systému. Miniaturizace vede od zmenšování částic sorbentů, přes využití nanočástic až po technologii separací na čipu<sup>38</sup>.

Vedle patrně nejrozšířenějších chromatografických technik (HPLC a GC) jsou poznatky z oblasti nanotechnologie aplikovány především v elektromigračních metodách – kapilární elektroforéze (CE) a kapilární elektrochromatografii (CEC). Modifikované nanočástice se zde používají jako aditivum do základního elektrolytu (CE), modifikátor vnitřní stěny kapiláry (CE nebo CEC) nebo jako separační médium (CEC). Především ze dvou důvodů se zdá využití

nanočástic velice perspektivní v CEC. Jde jednak o malý průměr částic, který umožňuje jejich plnění do používaných kapilár (publikována byla dokonce i práce kontinuálního „plnění“ kapiláry během analýzy<sup>39</sup>, a jednak jejich povrchový náboj, který je velmi častý a který podporuje elektroosmotický tok).

„Lab-on-chip“ neboli laboratoř na čipu je koncept celkové miniaturizace rozvíjený od 80. let a vhodný opět především pro elektromigrační metody, u kterých je pohyb analytů separačním systémem způsoben pouze vloženým elektrickým napětím<sup>40,41</sup>. Současné aplikace jsou založeny na komplementaritě bioafinitních interakcí (detekce DNA, analýza jejich fragmentů nebo analýza založená na interakci protilátka-antigen).

### 2.4. Ostatní metody

Kromě výše uvedených použití existují i další, např. nanočástice zlata byly použity pro stanovení aminioliů pomocí MALDI/MS (cit.<sup>42</sup>), nanočástice imobilizované na hemoglobinu byly použity pro jeho stanovení metodou induktivního plazmatu spojeného s hmotnostní spektrometrií<sup>43</sup> (bylo dosaženo stejné meze detekce jako při použití metody založené na imunoreakci) a nebo byly nanočástice použity ke zlepšení imunochromatografických testovacích proužků<sup>44</sup>.

## 3. Závěr

V současné době se začíná objevovat velké množství publikací zabývajících se aplikací modifikovaných nanočástic pro analytické účely. Je to dáno zejména zvládnutou technikou přípravy a modifikace nanočástic, což umožňuje nové přístupy v elektrochemických, spektroskopických a separačních metodách.

## LITERATURA

1. Bönnemann H., Richards R. M.: *Eur. J. Inorg. Chem.* 2001, 2455.
2. Cushing B. L., Kolesnichenko V. L., O'Connor C. J.: *Chem. Rev.* 104, 3893 (2004).
3. Daniel M.-C., Astruc D.: *Chem. Rev.* 104, 293 (2004).
4. Katz E., Willner I.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 43, 6042 (2004).
5. Shenhar R., Rotello V. M.: *Acc. Chem. Res.* 36, 549 (2005).
6. Hicks J. F., Miles D. T., Murray R. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 13322 (2002).
7. Chen S., Murray R. W.: *J. Phys. Chem., B* 103, 9996 (1999).
8. Turkevitch J., Stevenson P. C., Hillier J.: *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55 (1951).
9. Yonezawa T., Onoue S., Kimizuka N.: *Langmuir* 16, 5218 (2000).
10. Wang L., Xia T., Liu J., Wang L., Chen H., Dong L.,

- Bian G.: *Spectrochim. Acta, Part A* 62, 565 (2005).
11. Brust M., Fink J., Bethell D., Schiffrin D. J., Kiely C.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1995, 1655.
  12. Shi X., Wang L., Kariuki N., Luo J., Zhong C.-J., Lu S.: *Sens. Actuators, B* 117, 65 (2006).
  13. Liu L., Wang L., Yin H., Li Y., He X.: *Anal. Lett.* 39, 879 (2006).
  14. Borato C. E., Leite F. L., Mattoso L. H. C., Goy R. C., Campana Filho S. P.: *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul* 13, 1101 (2006).
  15. Wang L., Bai J., Huang P., Wang H., Zhang L., Zhao Y.: *Electrochem. Commun.* 8, 1035 (2006).
  16. Song Y.-S., Muthuraman G., Chen Y.-Z., Lin C.-C., Zen J.-M.: *Electroanalysis* 18, 1763 (2006).
  17. Welch C. M., Hyde M. E., Banks C. E., Compton R. G.: *Anal. Sci.* 21, 1421 (2005).
  18. Siswana M., Ozoemena K. I., Nyokong T.: *Talanta* 69, 1136 (2006).
  19. Song Y.-S., Muthuraman G., Zen J.-M.: *Electrochem. Commun.* 8, 1369 (2006).
  20. Seballos L., Zhang J. Z., Sutphen R.: *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 763 (2005).
  21. Wang J.: *Anal. Chim. Acta* 500, 247 (2003).
  22. Kreibig U., Vollmer M.: *Optical Properties of Metal Clusters*. Springer-Verlag, Berlin 1995.
  23. Obare S. O., Hollowell R. E., Murphy C. J.: *Langmuir* 18, 10407 (2002).
  24. Lin S.-Y., Chen C., Lin M.-C., Hsu H.-F.: *Anal. Chem.* 77, 4821 (2005).
  25. Tkachenko A. G., Xie H., Coleman D., Glomm W., Ryan J., Anderson M. F., Franzen S., Feldheim D. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4700 (2003).
  26. Hone D. C., Haines A. H., Russell D. A.: *Langmuir* 19, 7141 (2003).
  27. Lin S.-Y., Wu S.-H., Chen C.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 45, 4948 (2006).
  28. Famulok M., Mayer G.: *Nature* 439, 666 (2006).
  29. Ma Y., Li N., Yang C., Yang X.: *Colloids Surf., A* 269, 1 (2005).
  30. Ding F., Zhao H., Jin L., Zheng D.: *Anal. Chim. Acta* 566, 136 (2006).
  31. Chen K., Vo-Dinh K.-C., Yan F., Wabuyele M. B., Vo-Dinh T.: *Anal. Chim. Acta* 569, 234 (2006).
  32. Liu S. P., Yang Z., Liu Z. F., Liu J. T., Shi Y.: *Anal. Chim. Acta* 572, 283 (2006).
  33. Huhtinen P., Vaarno J., Soukka T., Lövgren T., Härämä H.: *Nanotechnology* 15, 1708 (2004).
  34. Maxwell D. J., Taylor J. R., Nie S.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 9606 (2002).
  35. Vashist S. K., Tewari R., Bajpai R. P., Bharadwaj L. M., Raiteri R.: *J. Nanotech. Online* 2, 1 (2006).
  36. Zhong P., Yu Y., Wu J., Lai Y., Chen B., Long Z., Liang C.: *Talanta* 70, 902 (2006).
  37. Chen J., Gao Y., Xu Z., Wu G., Chen Y., Zhu C.: *Anal. Chim. Acta* 577, 77 (2006).
  38. Guihen E., Glennon J. D.: *Anal. Lett.* 36, 3309 (2003).
  39. Viberg P., Jornten-Karlsson M., Petersson P., Spégel P., Nilsson S.: *Anal. Chem.* 74, 4595 (2002).
  40. Pumera M., Wang J., Grushka E., Polsky R.: *Anal. Chem.* 73, 5625 (2001).
  41. Pumera M.: *Talanta* 66, 1048 (2005).
  42. Huang Y.-F., Chang H.-T.: *Anal. Chem.* 78, 1485 (2006).
  43. Zhang C., Zhang Z., Yu B., Shi J., Zhang X.: *Anal. Chem.* 74, 96 (2002).
  44. Tanaka R., Yuhi T., Nagatani N., Endo T., Kerman K., Takamura Y., Tamiya E.: *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1414 (2006).

**P. Řezanka, K. Záruba, and V. Král** (*Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic*): **Application of Modified Nanoparticles in Analytical Chemistry**

A brief summary of applications of modified nanoparticles in analytical chemistry is presented. Electrochemical (voltammetric and potentiometric), spectral (absorption, fluorescence, and light scattering) and separation methods using nanoparticles are described. Modified nanoparticles are used to enhance selectivity, to decrease the limit of detection and in separation techniques.